

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



JC971 U.S. PRO
09/899295
07/06/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 33 353.2
Anmeldetag: 08. Juli 2000
Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE
Bezeichnung: Breit einsetzbares Verfahren zur Identifizierung von
Modulatoren von G-Protein gekoppelten Rezeptoren
IPC: C 12 Q, C 12 N, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 08. Februar 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Joost

Beschreibung

5 Breit einsetzbares Verfahren zur Identifizierung von Modulatoren von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die Erfindung bezieht sich auf ein breit einsetzbares Verfahren zur Identifizierung von chemischen Verbindungen, welche G-Protein gekoppelten Rezeptoren

10 modulieren, mittels neuer Hybrid-G-Proteine mit sehr weiter Rezeptorspezifität sowie auf chemischen Verbindungen, welche durch ein solches Verfahren identifiziert werden können.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse. Sie stellen eine der wichtigsten, bisher bekannten Proteinfamilien dar und man nimmt an, daß im menschlichen Genom etwa 1000 Gene für diese Rezeptorklasse kodieren. GPCRs haben eine charakteristische Struktur: Es handelt sich um Peptidfäden, die sich siebenfach in Form von α -Helices durch die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran winden, wobei sie sich kreisförmig anordnen. Man schätzt, daß etwa 60 % der gegenwärtig verfügbaren verschreibungspflichtigen Arzneimittel an GPCRs binden. Dies unterstreicht die bedeutende Rolle dieser Rezeptorklasse für die arzneimittelforschende Industrie.

Alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren funktionieren nach einem gemeinsamen

25 Grundmuster: die Bindung eines extrazellulären Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins so, daß dieses Kontakt mit einem G-Protein aufnehmen kann. Die an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran gelegenen G-Proteine sind die Vermittler des extrazellulären Signals in das Zellinnere und können dort verschiedene Reaktionen auslösen.

30 GPCRs stellen die bisher bedeutendsten therapeutischen Zielproteine dar. Schätzungsweise 40% der vom Arzt verordneten Arzneimittel wirken als Agonisten oder Antagonisten von GPCRs. Aufgrund der Größe und Bedeutung der Proteinfamilie und angesichts Tatsache, daß für viele GPCRs noch keine

chemischen Bindepartner bekannt sind (orphan GPCRs), ist davon auszugehen, daß diese Rezeptorklasse in Zukunft eines der wichtigsten Reservoirs für geeignete Zielproteine bei der Suche nach neuen Arzneistoffen sein wird

5 GPCRs sind integrale Membranproteine. Sie übertragen ein Signal vermittelt über einen meist hydrophilen Signalstoff, der auf der äußeren Seite der Zelle gebunden wird, über eine Familie von Guanin-Nucleotid-bindenden Proteinen, sogenannten G-Proteinen, ins Zellinnere. Dabei lösen sie in Abhängigkeit von der Spezifität des Rezeptors und der dadurch aktivierten G-Proteine verschiedene

10 Signaltransduktionswege aus. Je nach Typ des Rezeptors werden verschiedene Wirkungen hervorgerufen, die alle die Bildung von „second messengers“ zur Folge haben. So kann über die Aktivierung einer membranständigen Adenylat-Cyclase der intracelluläre cAMP Spiegel ansteigen bzw. bei einer Hemmung abfallen. Die Stimulierung einer cGMP-spezifischen Phosphodiesterase kann zur Absenkung des cGMP-Spiegels führen. Weiterhin kann das aktivierte G-Protein über die Bindung an einen Ionenkanal beispielweise zum Anstieg von Ca^{2+} - oder K^+ -Ionen führen. Weiterhin kann über ein aktiviertes G-Protein die Aktivierung einer Phospholipase und damit die Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol bewirkt werden. Diese wiederum führen entweder zum Ca^{2+} -Anstieg oder zur Aktivierung einer Proteinkinase C, mit weiteren Effekten in beiden Fällen. Second messenger sind intrazelluläre Botenmoleküle wie beispielsweise cAMP, cGMP, Ca^{2+} oder andere, welche über die Aktivierung oder Deaktivierung intrazellulärer Proteine Reaktionen in der Zelle auslösen.

25 Die heterotrimeren G-Proteine liegen an der Innenseite der Plasmamebran. Sie bestehen aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Ein aktiverter Rezeptor nimmt Kontakt auf mit dem G-Protein-Heterotrimer, welches daraufhin in eine α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert. Sowohl die aktivierte α -Untereinheit als auch der $\beta\gamma$ -Komplex können intrazelluläre Effektorproteine beeinflussen. Die G-Protein- α -Untereinheit Familie wird derzeit in vier verschiedene Klassen eingeteilt (G α s-, G α i-, G α q- und G α 12-Klasse). GPCRs werden entsprechend des in die Signaltransduktion eingebundenen G-Proteins klassifiziert.

D.h., GPCRs der Gs-Klasse vermitteln über Aktivierung von $\text{G}\alpha\text{s}$ die Stimulation der Adenylatcyclase und erhöhen die intrazelluläre cAMP-Konzentration, GPCRs der Gi-Klasse vermitteln über Aktivierung von $\text{G}\alpha\text{i}$ eine Hemmung der Adenylatzyklase und erniedrigen intrazelluläres cAMP

5 GPCRs der Gq-Klasse vermitteln über Aktivierung von $\text{G}\alpha\text{q}$ eine Stimulation verschiedener PLC β -Isoformen und führen zu einer Hydrolyse von membranständigem Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat zu Diacylglycerol und Inositoltriphosphat (IP3). IP3 setzt aus intrazellulären Speichern Ca^{2+} frei.

Die meisten GPCRs können nur mit einer G-Protein- α -Untereinheit Familie Kontakt 10 aufnehmen, d.h., sie besitzen Selektivität für einen bestimmten Signaltransduktionsweg. Für den Zweck ein Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe chemische Verbindungen identifiziert werden sollen, die GPCR abhängige Signaltransduktionswege modulieren, ist diese enge Spezifität sehr hinderlich.

5 Darüberhinaus liefern nur solche Signaltransduktionswege ein geeignetes Signal, welches sich in einem Assaytyp mit hohem Probendurchsatz (= High Throughput Screening = HTS)) verwerten lässt, bei denen z.B. die G-Proteinaktivierung zum Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt.

Solche G-Proteine mit geänderter Rezeptorspezifität und unterschiedlicher Anbindung an einen Signaltransduktionsweg können durch Aneinanderfügen von Bestandteilen aus verschiedenen G-Proteinen zu Hybrid-G-Proteinen mittels der Methoden der Molekularbiologie und Biochemie konstruiert werden.

Hybrid-G-Proteine sind Fusionskonstrukte, die innerhalb eines Proteins Sequenzen verschiedener $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten vereinigen. So kann z.B. durch die Fusion der

25 Rezeptorerkennungsregion von $\text{G}\alpha\text{i}$ mit der Effektor-Aktivierungsregion von $\text{G}\alpha\text{q}$ ein $\text{G}\alpha\text{q}/\text{i}$ -Hybrid hergestellt werden, das Signale von Gi-gekoppelten Rezeptoren empfängt, aber den $\text{G}\alpha\text{q}$ -PLC β -Signaltransduktionsweg anschaltet. Ein derartiges Hybrid, bei welchem die C-terminalen 5 Aminosäuren von $\text{G}\alpha\text{q}$ durch die entsprechende $\text{G}\alpha\text{i}$ -Sequenz ersetzt worden ist ($\text{G}\alpha\text{q}i5$) wurde von Conklin et al.,

30 Nature 363, 274 - 276 (1993) erstmalig beschrieben.

Diese „Umkopplung“ von Rezeptoren hat den Vorteil, daß der Assayendpunkt (Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur Hemmung der

Adenylatcyclase) einfacher durch meßtechnische Verfahren zugänglich ist und im High-Throughput-Screening verwendet werden kann.

Nachteil dieser $\text{G}\alpha_q/\text{G}\alpha_i$ Fusionskonstrukte ist jedoch, daß sie einige GPCRs wie z.B. den SSTR1-Rezeptor q15 nicht aktivieren können (Conklin et al., Mol. Pharmacol. 50, 885 – 890 (1996)).

Ebenso wurden Fusionskonstrukte zwischen $\text{G}\alpha_q$ und $\text{G}\alpha_s$ beschrieben. Auch diese besitzen den Nachteil, daß sie nicht alle G_s -gekoppelten Rezeptoren wie beispielsweise den $\beta 2$ adrenergen Rezeptor oder den Dopamin D1 Rezeptor an den $\text{PLC}\beta$ -Signaltransduktionsweg anbinden können.

Neben den C-terminalen Modifikationen zur Änderung der Anbindung von Rezeptoren an bestimmte Signaltransduktionswege wurde eine N-terminale Modifikation von $\text{G}\alpha_q$ beschrieben, die zur Rezeptorpromiskuität führt. Unter Rezeptorpromiskuität soll dabei die Fähigkeit eines G-Proteins verstanden werden, Signale von unterschiedlichen Rezeptoren aufzunehmen und weiterleiten zu können.

Es handelt sich um ein $\text{G}\alpha_q$ -Protein, bei welchem die hochkonservierte, N-terminale, 6aa umfassende Region deletiert wurde (Kostenis et al., J. Biol. Chem. 272, 19107 - 19110 (1997)). Diese Deletion erlaubt dem resultierenden G_q (auch $\text{G}\alpha_6$ genannt), nicht nur Signale von G_q - sondern auch von G_s - oder $\text{G}_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptoren zu empfangen und an $\text{PLC}\beta$ weiterzuleiten.

Diese $\text{G}\alpha$ -Untereinheit erfaßt nun auch Rezeptoren wie den SSTR1-Somatostatin Rezeptor, den Dopamin D1 und den adrenergen $\beta 2$ -Rezeptor. Allerdings kann der Rezeptor edg5 auch durch dieses G-Protein nicht erfaßt werden. Darüberhinaus ist die Signalintensität dieses G-Proteins so schwach, daß es in der Praxis nicht verwendet werden kann (Kostenis et al., J. Biol. Chem. 272, 19107 - 19110 (1997)).

Weiterhin bekannt ist mit $\text{G}\alpha 16$ eine $\text{G}\alpha$ -Untereinheit, die GPCRs aus verschiedenen funktionellen Klassen an den $\text{PLC}\beta\text{-Ca}^{2+}$ -Signaltransduktionsweg anbindet. Es handelt sich praktisch um ein von Natur aus unselektives G-Protein. Aber auch diese Untereinheit ist nicht universell einsetzbar, denn Rezeptoren wie der edg5-Rezeptor oder der SSTR1-Somatostatin Rezeptor koppeln nicht oder nur schwach an $\text{G}\alpha 16$.

Aus diesem Grunde wäre es von großem Nutzen, wenn ein G-Protein zur Verfügung stehen würde, welches durch weitere funktionellen Klassen der GPCRs aktiviert werden könnte und darüberhinaus in der Zelle ein ausreichend starkes Signal ergeben würde, welches in einem Assay insbesondere einem High Throughput-Assay

zur Identifizierung von Verbindungen, die GPCRs und/oder die jeweils abhängigen Signaltransduktionswege modulieren, verwertet werden könnte, wie z.B. die Erhöhung oder Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht demnach darin, weitere Hybrid-G-

5 Proteine für Screeningverfahren zur Identifizierung von chemischen Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die sich darin auszeichnen, daß sie eine sehr breite Spezifität hinsichtlich der erkennbaren GPCRs aufweisen und diese G-Proteine an einen Signalweg koppeln, der zu Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Zusätzlich werden sie so hoch exprimiert, daß die Signalintensität verbessert

10 wird.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung einer chemischen Verbindung, welcher die Wirkung wenigstens eines von einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) abhängigen Signaltransduktionswegs eines biologischen Organismus

15 modifiziert,

wobei besagtes Verfahren folgende Verfahrensschritte enthält:

- a) Bereitstellung mindestens einer Zelle enthaltend mindestens einen GPCR abhängigen Signaltransduktionsweg, in welcher ein oder mehr als ein G-Protein hergestellt wird;
- b) Bereitstellung mindestens einer zu untersuchenden chemischen Verbindung;
- c) In-Kontakt-Bringen einer Zelle gemäß a) mit einer zu untersuchenden chemischen Verbindung gemäß b);
- d) Bestimmung des quantitativen oder qualitativen Effekts einer zu untersuchenden chemischen Verbindung aus b) auf den Signaltransduktionsweg einer Zelle aus a) mittels eines vom Signaltransduktionsweg abhängigen meßbaren Signals.

25

Die Modifizierung der Wirkung wenigstens eines von einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) abhängigen Signaltransduktionswegs eines biologischen

30 Organismus kann inhibierend oder stimulierend erfolgen. Eine inhibierende Wirkung einer chemischen Verbindung liegt vor, wenn das vom Signaltransduktionsweg abhängige meßbare Signal in Anwesenheit der chemischen Verbindung schwächer ausfällt als wenn diese weggelassen wird. Verbindungen, die eine solche Wirkung

hervorrufen, werden auch Antagonisten genannt. Andererseits liegt eine stimulierende Wirkung einer chemischen Verbindung vor, wenn das vom Signaltransduktionsweg abhängige meßbare Signal stärker ausfällt als wenn die chemische Verbindung weggelassen wird. Solche Verbindungen werden auch

5 Agonisten genannt.

Das Verfahren bedient sich in einer bevorzugten Ausführungsweise einer Zelle, in welcher wenigstens zwei G-Proteine hergestellt werden. Diese G-Proteine können von einem oder unterschiedlichen GPCRs abhängen. Grundsätzlich kommen zur Durchführung des Verfahrens alle geeigneten G-Proteine ungeachtet ihrer

10 Rezeptorspezifität, ihrer Sequenz, ihres Aufbaus, der Herkunft bezüglich Zelle, Gewebe oder Organ oder bezüglich der Spezies, für die sie spezifisch sind, in Frage. Bevorzugt wird in der Zelle wenigstens ein G-Protein aus -6qi4myr, -6qs5myr, -6qi4, -6qs5 hergestellt. Bei den G-Proteinen -6qi4myr, -6qs5myr, -6qi4, -6qs5 handelt es sich um Hybrid-G-Proteine, die aus den Anteilen unterschiedlicher G-Proteine der 15 Maus zusammengesetzt wurden und in einigen Fällen zusätzliche Modifikationen enthalten. Die G-Proteine können von der Zelle einzeln oder in Kombination hergestellt werden. Insbesondere kann von einer Zelle abgesehen von den bereits erwähnten Hybrid-G-Proteinen auch Galpha16 hergestellt werden. Jedes der G-Proteine kann einzeln oder in Kombination mit einem oder mehreren anderen G-Proteinen in einer Zelle vorliegen. Die Herstellung von Galpha16 in einer Zelle soll dabei aber immer so erfolgen, daß es nie alleine sondern in Kombination mit einem anderen der vorstehend erwähnten G-Proteine hergestellt wird.

25 Die Aminosäuresequenzen der bevorzugten G-Proteine sind offenbar für -6qi4myr in Seq ID Nr. 2, für -6qi5myr in Seq ID Nr. 4, für -6qi4 in Seq ID Nr. 6, -6qs5 in Seq ID Nr. 8 und für Galpha16 in Seq ID Nr. 10.

Die Bereitstellung einer chemischen Verbindung erfolgt üblicherweise in gelöster Form. Bevorzugt wird zur Lösung der chemischen Verbindung Wasser verwendet. Die Lösung kann neben dem Lösungsmittel Puffersubstanzen, Salze oder Hilfsstoffe wie Lösungsvermittler, Detergentien, Konservierungsstoffe oder anderes enthalten

30

Die Bereitstellung einer Zelle umfaßt deren Herstellung, Anzucht und Weiterverarbeitung. Die Bereitstellung erfolgt beispielsweise durch Präparation geeigneten Zellmaterials aus Organen oder Geweben oder durch die Vermehrung von geeigneten Zelllinien oder Mikroorganismen. Für die Anzucht können

verschiedene geeignete Nährmedien verwendet werden. Die Zellen werden bei der für den Organismus optimalen Temperaturgehalten. Gegebenenfalls werden dem jeweils verwendeten Wachstumsmedium Konservierungsmittel, Antibiotika, pH-Indikatoren, Blutserumbestandteile, Blutserum, Hilfsstoffe oder anderes zugegeben.

5 Verfahren zur Herstellung, Anzucht und Weiterverarbeitung sind in Standardwerken beschrieben. (Beispiel: Basic Cell Culture; Ed. J.M. Davis; IRL Press; 1994).

Im vorstehend beschriebenen Verfahren wird in bevorzugten Ausführungsformen die Zelle einer Wirbeltierspezies, einer Insektspezies, eines *C. elegans* oder einer Hefe bereitgestellt. In besonders bevorzugten Ausführungsformen wird die Zelle einer

10 *Hela*-, 293-, Cos-, CHO-Zelle oder *Saccharomyces cerevisiae* bereitgestellt.

Zur Bestimmung des quantitativen oder qualitativen Effekts einer zu untersuchenden chemischen Verbindung auf den Signaltransduktionsweg einer Zelle eines vom Signaltransduktionsweg abhängigen meßbaren Signals wird in einer bevorzugten

15 Ausführungsform die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration verwendet werden. Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration lässt sich beispielsweise durch Anwendung von Aequorin, einem Farbstoff, oder der FLIPRTM-Technologie der Firma „Molecular Devices“ nachweisen.

Die wie vorstehen beschriebenen Verfahren können in einer bevorzugten Ausführungsform zur Identifizierung eines Arzneimittels verwendet werden.

Die Erfindung betrifft auch mindestens eine chemische Verbindung, welche die Wirkung wenigstens eines von einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) abhängigen Signaltransduktionswegs eines biologischen Organismus modifiziert,

25 wobei diese chemische Verbindung durch mindestens ein Verfahren dieser Erfindung identifiziert wurde. Solche chemischen Verbindungen könnten beispielsweise Abwandlungen bezüglich der chemischen Struktur von hydrophilen Signalstoffen, die GPCRs induzieren, wie bestimmte Hormone, Geruchsstoffe, bestimmte Arzneimittel, umfassen.

30 Die Erfindung betrifft ferner eine Polynukleotidsequenz codierend für ein Polypeptid mit der Eigenschaft eines G-Proteins, wobei das Polypeptid aus einer der folgenden Sequenzen ausgewählt wird:

a) ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß Seq ID Nr. 2 , Seq ID Nr. 4, Seq ID Nr. 6 oder Seq ID Nr. 8;

b) ein Polypeptid gemäß a), dem eine oder mehrere Aminosäuren fehlen;

c) ein Polypeptid gemäß a), bei dem eine oder mehrere Aminosäuren hinzugefügt sind;

5 d) eine allele Variante des Polypeptids gemäß a).

Die allelen Varianten umfassen alle Polypeptide, die sich aus der Basenzusammensetzung der charakteristischen Form des Gens am definierten Genlocus für die jeweiligen Anteilspartner der Hybridproteine ergeben.

10 Die Erfindung betrifft außerdem ein Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, wobei die Polynukleotidsequenz aus einer der folgenden Sequenzen ausgewählt wird:

a) eine Polynucleotidsequenz gemäß Seq ID Nr. 1, Seq ID Nr. 3, Seq ID Nr. 5 oder Seq ID Nr. 7 oder deren entsprechende komplementäre Sequenz;

b) eine Polynukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einer Polynukleotidsequenz gemäß a) hybridisiert.

Die Stringenz einer Lösung wird bestimmt durch deren Temperatur und Salzgehalt.

Mit der Stringenz kann das Ausmaß der Basenpaarung zweier homologer Nukleotidsequenzen eingestellt werden. Die Stringenz ist abhängig von der Länge und der Basenzusammensetzung eines Polynukleotids. Stringente Bedingungen im Sinne dieser Erfindung liegen vor, wenn die Polynukleotidsequenz und die hybridisierende Sequenz eine Übereinstimmung von 95% oder mehr aufweisen.

25 Eine bevorzugte Ausführungsform einer Polynukleotidsequenz bzw. eines Polynucleotids wie vorstehend beschrieben ist ein Polynukleotid, welches Bestandteil einer rekombinanten Vektorkonstruktion ist. Rekombinante Vektorkonstruktionen können unter Zuhilfeneahme des einschlägigen Fachwissens, wie dargestellt beispielsweise in „F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, New York“, hergestellt werden. Dabei wird ein Polynukleotid 30 codierend für eine Aminosäuresequenz gemäß einer der im vorhergehenden beschriebenen Sequenzinformationen (Seq ID Nr. 2, 4, 6, 8) oder eine Polynukleotidsequenz gemäß einer der im vorhergehenden beschriebenen Sequenzinformationen (Seq ID No. 1, 3, 5, 7) in einen Basisvektor eingebaut. Als Basisvektor soll ein Vektor verstanden werden, in welchen eine

Polynukleotidsequenz eines Polynukleotids mittels der Methoden der Molekularbiologie eingebaut und in einem Mikroorganismus beispielsweise einem Bakterium, Pilz oder der Zelle einer Zellkultur kloniert werden kann. Der Basisvektor kann beispielsweise aus einem Plasmid mit einem Antibiotikumresistenzmarker, 5 einem „origin of replication“ geeignet zur Vermehrung des Plasmids in Bakterien oder Zellkulturen, sowie einem Promotor geeignet zur Expression eines bestehen. Der Basisvektor kann beispielsweise auch aus einem Phagenvektor, einem Phagemidvektor, einem Phasmidvektor, einem Cosmidvektor, einem Virusvektor, einem YAC-Vektor oder anderen Vektortyp bestehen. Beispiele für Basisvektoren 10 sind pUC 18, pUC19, pBLUEScript, pKS, pSK und andere. Der Einbau des einzubauenden Polynukleotids erfolgt über geeignete Restriktionsschnittstellen mittels der entsprechenden Restriktionsenzyme, welche kommerziell von Firmen wie BioLabs, Roche Diagnostics, Stratagene und anderen angeboten werden. Solche Restriktionsschnittstellen können beispielsweise die Erkennungsstellen der 15 Restriktionsenzyme BamHI, EcoRI, SalI, EcoRV und andere sein.

Die rekombinante Vektorkonstruktion besteht in einer bevorzugten Ausführungsform aus einem in Eukaryonten und/oder Prokaryonten verwendbaren Expressionsvektor. Ein Expressionsvektor enthält einen Promotor, der funktionell mit einer Polynukleotidsequenz verbunden werden kann, so daß ein von dieser Polynukleotidsequenz codiertes Protein in einem biologischen Organismus beispielsweise einem Bakterium, Pilz oder der Zelle einer eukaryotischen Zellliniesynthetisiert wird. Der Promotor kann induzierbar sein beispielsweise mittels Tryptophan oder er kann konstitutiv aktiv sein. Beispiele für 25 Expressionsvektoren sind pUC18, pUC19, pBLUEScript, pcDNA3.1 oder andere.

Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf eine Wirtszelle, welche ein Polynukleotid oder eine wie vorstehend beschriebene rekombinante Vektorkonstruktion enthalten kann. Die Wirtszelle besteht in einer bevorzugten Ausführungsform aus einer 30 humanen Zelle. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen besteht die Wirtszelle aus der Zelle einer Wirbeltierspezies, einer Insektenart, eines *C. elegans*, eines Bakterium oder einer Hefe. In besonders bevorzugten Ausführungsformen besteht die Zelle aus einer Hela-, 293-, Cos-, CHO-Zelle, der Zelle eines *Escherichia coli* oder der Zelle eines *Saccharomyces cerevisiae*. Darüberhinaus können andere

eukaryotische Zellen insbesondere Zelllinien, Bakterien insbesondere *Bacillus* spec., *Streptomyces* spec. oder Pilze insbesondere *Penicillium* spec, *Aspergillus* spec. Verwendet werden.

5 Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung einer wie vorstehend beschriebenen Wirtszelle durch Einführung eines Polynukleotids gemäß einem oder mehreren der Polynukleotidsequenzen wie offenbart in Seq ID Nr. (1 - 8) oder einer wie zuvor charakterisierten rekombinanten Vektorkonstruktion in eine eukaryotische oder prokaryotische Zelle. Die Einführung der Polynukleotidsequenzen kann
10 beispielsweise durch Elektroporation oder Transformation der eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen mit der Polynukleotidsequenz, weiterhin durch Ca^{2+} -Phosphat-Präzipitation der eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen zusammen mit der Polynukleotidsequenz oder anderen Methoden erfolgen.

15 Eine solche Wirtszelle kann zur Durchführung eines vorstehend beschriebenen Verfahrens dieser Erfindung verwendet werden.

Die Erfindung bezieht sich auch auf ein Protein mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus einer der folgenden Sequenzen: Seq ID Nr. 2, Seq ID Nr. 4, Seq ID
20 Nr. 6, Seq ID Nr. 8.

Darüberhinaus bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins bestehend aus einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus einer der Sequenzen Seq ID Nr. 2, Seq ID Nr. 4, Seq ID Nr. 6, Seq ID Nr. 8 enthaltend
25 folgende Verfahrensschritte:

- a) Herstellung einer Wirtszelle enthaltend eine entsprechende Polynukleotidsequenz und hergestellt wie im vorhergehenden beschrieben;
- b) Anzucht dieser Wirtszelle in einem für die Wirtszelle geeigneten Wachstumsmedium sowie eventuell die Induktion der Expression des Proteins;
- c) Gewinnung des Zellmaterials und Aufschluß der Zellen;
- d) Abtrennung eines Proteins mittels biochemischer Methoden zur Proteinreinigung.

Für die Herstellung und Reinigung der bezeichneten Proteine können bekannte Methoden wie beschrieben in „F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, New York“ entsprechend verwendet werden.

Ein Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß Seq ID Nr. 2, 4, 6, 8 oder

5 hergestellt nach dem dargestellten Verfahren kann zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden.

Beispiele

Beispiel 1:

10 Aktivierung eines Signaltransduktionswegs durch die $\text{G}\alpha$ -Protein-Mutante --6q durch verschiedene Rezeptoren

15 COS7 Zellen wurden in DMEM (Dulbeccos's modified Eagle's Medium) unter Zusatz von 10% FCS (Fötales Kälberserum) bei 37°C (5%CO₂) kultiviert. Für

20 Transfektionen wurden 1×10^6 Zellen in 100-mm Platten ausgesät. Etwa 24 h später wurden die Zellen mit den Expressionsplasmiden αq oder --6q (1 μg DNA/100 mm Platte) und jeweils eines der folgenden folgenden Rezeptorkonstrukte (4 μg DNA/100 mm Platte) kotransformiert: M2 (Muskarinrezeptor in pCD), D2 (Dopamin Rezeptor in pCDNA1), kappa (Opioid Rezeptor in pCDNA3), SSTR1 (Somatostatin-Rezeptor in pCMV), A1 (Adenosin Rezeptor in CDM7), D1 (Dopamin Rezeptor in pCDNA1), V2 (Vasopressin Rezeptor in pCD-ps), $\beta 2$ (adrenerger Rezeptor in pSVL). Etwa 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in 6well Platten in gleichen Portionen aufgeteilt und in DMEM 3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [3H]myo-inositol (20Ci/mmol) zugegeben.

25 Nach 24 stündiger Inkubation wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit HBSS (+ 10 mM LiCl) für 20 min inkubiert. Danach wurden die Zellen für eine Stunde mit den entsprechenden Agonisten stimuliert und der Anstieg der intrazellulären Inositolmonophosphate durch Anionen Austausch Chromatographie bestimmt.

Der $\text{G}\alpha$ -Protein-Mutanten --6q fehlen verglichen mit der Wildtypsequenz die sechs hochkonservierten Aminosäuresequenzen des aminoterminalen Endes. Solche

30 Konstrukte sind in Fig. 1 bezüglich des Aminoterminal dargestellt. Die Wildtypsequenz ist als αq (WTq) bezeichnet. Die Ergebnisse im folgenden wurden mit der $\text{G}\alpha$ -Protein Konstruktion --6q erhalten. Fig. 1 gibt darüberhinaus noch weitere Sequenzbeispiele. Die Herstellung solcher Mutanten oder der verwendeten

Rezeptorkonstrukte erfolgte mit Hilfe von Standardmethoden der Molekularbiologie wie ausführlich beschrieben beispielsweise in „F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, New York“.

5 COS7 Zellen, die WTq oder -6q und verschiedene Gi/o- (A) oder Gs-gekoppelte Rezeptoren (B) exprimieren wurden für 1 h (37°C) in An- und Abwesenheit der entsprechenden Agonisten (s.u.) inkubiert. Der Anstieg der intrazellulären IP1 Konzentration wurde wie im beigefügten Protokoll 1 gemessen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm S.E. von 3-7 unabhängigen Experimenten dar, jeweils als

10 Dreifachbestimmungen ausgeführt. Die folgenden Liganden wurden benutzt:

Fig. 2 A: m2 (Muskarin Rezeptor): Carbachol (100 μ M); D2 (Dopamin Rezeptor): (-)-Quinpirole (10 μ M); kappa (Opioid Rezeptor): (-)-U50488 (10 μ M); SSTR1 (Somatostatin Rezeptor): Somatostatin14 (1 μ M); B, A1 (Adenosin Rezeptor): R(-)-PIA (10mM);

15 Fig. 2 B: D1 (Dopamin Rezeptor): Dopamin (1mM); V2 (Vasopressin Rezeptor): AVP (1nM); β 2 (adrenerger Rezeptor): (-)-Isoproterenol (200 μ M). Die Nummern unterhalb der Abbildungen geben das Ausmaß der jeweiligen PLC Stimulation als relative Zunahme der PLC Stimulation von -6q zu WTq an.

20 Aus Fig. 2 wird ersichtlich, daß die G α -Protein-Mutante -6q eine IP1-Bildung in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rezeptorklassen stimuliert. IP1 ist ein Signalmoleköl, welches im PLC- β -Signaltransduktionsweg entsteht und im weiteren Verlauf der Signalweitergabe zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt. Die Versuchsergebnisse für -6q sind in Fig. 2 ins Verhältnis gesetzt zur

25 Stimulierung mittels des Wildtypkonstrucks (WTq) und einer weiteren Kontrolle mit dem Vektorkonstrukt ohne irgendeine G α -Insertion (vector). Die IP1- Freisetzung mittels des -6q-Konstrucks gelingt sowohl mit Gi/o gekoppelten (Fig. 2 A: m2, k-OR, SSTR1, A1) als auch mit Gs gekoppelten (Fig 2 B: D1, V2, β 2) Rezeptoren.

Beispiel 2:

Herstellung hochexprimierender Mutanten von G α -Proteinen mit breiter Rezeptorspezifität

5 Zuerst wurden hybride G-Protein α -Untereinheiten konstruiert, denen die sechs hochkonservierten Aminosäuren des Aminoterminus fehlen und die gleichzeitig am C-terminus entweder eine αi oder αs -Sequenz aufweisen. Entsprechend der enthaltenen αi -Sequenz bzw. αs -Sequenz erfolgt die Bezeichnung als -6qi4 oder -6qs5. Das Konstrukt -6qi4 verbindet die Gs- sowie einige Gi/o-gekoppelte Rezeptoren mit dem PLC β -Signaltransduktionsweg. Diese Rezeptoren erfaßt auch den SSTR1- oder den edg5-Rezeptor. Der edg5-Rezeptor läßt sich mit G α 16 nicht an den PLC β -Signaltransduktionsweg anbinden. G α 16 ist ein G-Protein mit breiter Rezeptorspezifität, welcher in WO 97/48820 (Titel: Promiscuous G-protein compositions and their use) offenbart ist.

10 Das Konstrukt -6qs5 bindet die Gi/o- sowie noch zusätzliche Gs-gekoppelte Rezeptoren an den PLC β -Signaltransduktionsweg und erfaßt nun auch Rezeptoren wie den Dopamin D1 oder den adrenergen $\beta 2$ -Rezeptor. Eine Kombination dieser beiden G-protein α -Untereinheiten in einer Zelllinie erfaßt damit ein weiteres Spektrum an GPCRs als jede Untereinheit für sich oder G α 16.

15 20 Die Anwendbarkeit in technischen Screeningverfahren ließe sich weiter verbessern, wenn die Expression dieser G α -Untereinheiten (-6qi4; -6qs5) erhöht würde, weil damit auch ein stärkeres Signal erzielt werden könnte.

Aus diesem Grunde wurden zusätzliche Myristoylierungs/Palmitoylierungs-

25 30 Erkennungssequenzen in den aminoterminalen Bereich der G α -Untereinheiten eingebaut. Dies führte zur Konstruktion der G \square Proteine -6qi4myr und -6qs5myr. Die Proteinsequenz von -6qi4myr und -6qs5myr bezüglich des Aminoterminus ist MGCC im Unterschied zu MACC der Ausgangssequenz der -6q-Varianten. Die neuen Konstrukte -6qi4myr und -6qs5myr enthalten nun eine Konsensus-Sequenz für die Myristoylierung/Palmitoylierung. -6qi4myr wurde aus -6qi4 und -6qs5myr wurde aus -6qs5 hergestellt. Es ist bekannt, daß die Enfernung von Myristyl- oder Palmitoylresten in G-Proteinen zu einer Umverteilung in der Zelle führen: Verlust von Palmitat- oder Myristatresten beeinflussen das Expressionsmuster der G-Proteine in

der Weise, daß Wegnahme der Fettsäurereste eine hauptsächlich zytosolische Lokalisation zur Folge hat. G-Protein α -Untereinheiten findet man sowohl in der Zellmembran als auch im Cytosol. Jedoch können nur die membranständigen G-Proteine die Signale der GPCRs an die intrazellulären Effektoren weiterleiten.

5 Bekannt waren nur die Konsequenzen der Entfernung einer Konsensussequenz für Palmitoylierung/Myristoylierung durch Mutation. Nicht bekannt hingegen war, daß die Einführung der zusätzlichen Konsensusstelle für die Myristoylierung/Palmitoylierung in den $\text{G}\alpha$ -Deletionsmutanten zur Erhöhung der Expression führt. Es konnte gezeigt werden, daß die Einführung zusätzlicher Palmitoylierungs/Myristoylierungsstellen 10 die in der Zellmembran exprimierte Menge an $\text{G}\alpha$ -Untereinheit steigert (Fig. 3, Fig 4). Im SDS-PAGE-Westernblot (Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese-Westernblot) von Fig. 3 ist zu erkennen, daß die Expression von -6qi4myr im Vergleich zu -6qi4 deutlich erhöht ist. In Fig. 4 ist ein 15 SDS-PAGE-Westernblot einer Fraktionierung in partikuläre Fraktion (p; Membranen enthaltend) und lösliche Fraktion (s; sc) von qwt und -6qi4myr dargestellt. Die höher myristoylierte/palmitoylierte Variante -6qi4myr ist nur in der partikulären Fraktion enthalten.

Jeweils 20 μg Membranproteine wurden dazu aus transfizierten COS7 Zellen 20 prepariert, durch SDS-PAGE Gelelektrophorese (10%) aufgetrennt und mittels Westernblot Analyse unter Verwendung des 12CA5 monoklonalen Antikörpers (Roche Biosciences) analysiert.

Alle G-Protein α Untereinheiten mit dem 12CA5 monoklonalen Antikörper (gekoppelt an horseradish-peroxidase), der gegen den HA-epitop tag gerichtet ist, detektiert. Der HA-tag ist in allen G-Protein Konstrukten enthalten. In qwt und qi5 ersetzt er die 25 Aminosäuren 125-130, in den N-terminal deletierten G-Proteinen (-6q, -6qi4, -6qi4myr) die Aminosäuren 119-124. Jeweils 20 μg Membranprotein, prepariert aus transfizierten COS7 Zellen wurden mittels SDS PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und die G-Protein α Untereinheiten mit dem 30 12CA5 Antikörper detektiert. Immunoreaktive G-Proteine wurden mit einem Chemilumineszenzsystem (Amersham) sichtbar gemacht.

Beispiel 3 :

Stimulierung verschiedener hoch exprimierter $\text{G}\alpha$ -Proteine mit breiter Rezeptorspezifität durch unterschiedliche Rezeptoren

5 Die Stimulierung der hoch exprimierten $\text{G}\alpha$ -Varianten $-6\text{qs}5\text{myr}$ und $-6\text{qi}4\text{myr}$ durch unterschiedliche Rezeptoren ist in Fig. 5 und Fig. 6 dargestellt. In Fig. 5 ist zu erkennen, daß $-6\text{qi}4\text{myr}$ ($=\Delta 6\text{qi}4\text{myr}$) durch Gi/o -gekoppelter Rezeptoren (beispielsweise Dopamin D2, edg5, CCR5, SSTR1, KOR) an den $\text{PLC}\beta$ -Signaltransduktionsweg angeschlossen wird und zu einem hohen Signal führt,

10 welches proportional der Ca^{2+} -Freisetzung verläuft. Als Kontrollen wurden ein Vektorkonstrukt sowie das $\text{G}\alpha 16$ -Protein (+16) verwendet. Fig. 6 zeigt, daß Gs -gekoppelte Rezeptoren durch $-6\text{qs}5\text{myr}$ ($=\Delta 6\text{qs}5\text{myr}$) an den $\text{PLC}\beta$ -Signaltransduktionsweg gebunden werden. Als Referenz dient auch hier das $\text{G}\alpha 16$.

15 Zur experimentellen Bestimmung des freigesetzten Ca^{2+} mittels des Aequorinsystems wurden CHO Zellen kotransfiziert mit dem Apoaequorin Expressionsplasmid cytAEQ/pCDNA1, der angegebenen Rezeptor DNA (SSTR1, KOR, D2, D1, beta2) sowie den G-Protein α Untereinheiten G16 und $-6\text{qi}4\text{myr}$ unter Verwendung von Lipofectamin. Nach 10stündiger Inkubation in OPTIMEM Medium

20 wurden die Zellen einmal mit RPMI 1640 Medium gewaschen und mit 5 μM Coelenterazine f in RPMI 1640 für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit den entsprechenden Rezeptoragonisten stimuliert: Somatostatin 14 für den SSTR1 Rezeptor, U50488 für den kappa Opioid Rezeptor, (-)-Quinpirol für den Dopamin D2 Rezeptor, Dopamin für den Dopamin D1

25 Rezeptor und Isoproterenol für den beta2-Rezeptor. Agoniststimulation der Gi/o -gekoppelten Rezeptoren (SSTR1, KOR, D2) und der Gs -gekoppelten Rezeptoren (D1, beta2) führt zu Aktivierung der Gproteine G16 sowie $-6\text{qi}4\text{myr}$ mit nachfolgender Stimulation der $\text{PLC}\beta$ und intrazellulärer Ca -Freisetzung. Ca -Bindung an den Apoaequorin-Coelenterazine Komplex führt zu Lichtemission, welche mit

30 einem Luminometer (TOPCount, Hewlett Packard) gemessen wurde.

Beschreibung der Figuren:

Fig. 1 gibt ein Alignement der aminoterminalen Bereiche verschiedener $\text{G}\alpha$ -Proteine wieder.

5 Fig. 2 zeigt eine Stimulation des PLC β -Signaltransduktionswegs mittels der $\Delta 6q$ - $\text{G}\alpha$ -Proteinvariation durch Gi/o gekoppelte (A) und Gs gekoppelte (B) Rezeptoren unter Verwendung der höchstmöglichen Konzentration des jeweiligen Agonisten.

Fig. 3 zeigt einen SDS-PAGE-Westernblot mit der Expression von $\Delta 6qi4myr$ im Vergleich zu $\Delta 6qi4$ erhöht ist. Daneben ist die Expression weiterer $\text{G}\alpha$ -Proteine

10 gezeigt.

In Fig. 4 ist ein SDS-PAGE-Westernblot abgebildet, auf dem eine Fraktionierung in partikuläre Fraktion (p; Membranen enthaltend) und lösliche Fraktion (s; sc) von qwt und $\Delta 6qi4myr$ dargestellt ist. Die Gprotein Untereinheiten wurden mit dem 12CA5 monoklonalen Antikörper detektiert und ergeben Proteinbanden in einer Größe von ~

15 42KD.

Fig. 5 zeigt die Anbindung verschiedener Gi/o-gekoppelter Rezeptoren durch $\Delta 6qi4myr$ ($=\Delta 6qi4myr$) an den PLC β -Signaltransduktionsweg. D2, Kappa und SSTR1 sind Gi/o-gekoppelte Rezeptoren. Als Kontrollen wurden ein Vektorkonstrukt sowie das $\text{G}\alpha 16$ -Protein (+16) verwendet.

20 Fig. 6 zeigt, daß Gs-gekoppelte Rezeptoren durch $\Delta 6qs5myr$ ($=\Delta 6qs5myr$) an den PLC β -Signaltransduktionsweg angebunden werden.

$\beta 1$, $\beta 2$ und D1 sind Gs-gekoppelte Rezeptoren. Als Referenz dient ein Vektorkonstrukt und das G-Protein $\text{G}\alpha 16$ (+16).

Fig. 7 zeigt die Anbindung des Gi/o-gekoppelten Dopamin D2 Rezeptors an den 25 PLC β -Ca-Signaltransduktionsweg in Gegenwart der wenig empfindlichen α -Untereinheit G16, in Gegenwart der sehr sensitiven G α -Untereinheit $\Delta 6qi4myr$ sowie in Kombination von G16 und $\Delta 6qi4myr$. Es ist offensichtlich, daß die potente Aktivierung der Calcium Freisetzung durch $\Delta 6qi4myr$ durch die Anwesenheit von G16 nicht beeinträchtigt wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung einer chemischen Verbindung, welcher die Wirkung wenigstens eines von einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) abhängigen Signaltransduktionswegs eines biologischen Organismus modifiziert, wobei besagtes Verfahren folgende Verfahrensschritte enthält:
 - 5 a) Bereitstellung mindestens einer Zelle enthaltend mindestens einen GPCR abhängigen Signaltransduktionsweg, in welcher ein oder mehr als ein G-Protein hergestellt wird;
 - 10 b) Bereitstellung mindestens einer zu untersuchenden chemischen Verbindung;
 - c) In-Kontakt-Bringen einer Zelle gemäß a) mit einer zu untersuchenden chemischen Verbindung gemäß b);
 - d) Bestimmung des quantitativen oder qualitativen Effekts einer zu untersuchenden chemischen Verbindung aus b) auf den Signaltransduktionsweg einer Zelle aus a) mittels eines vom Signaltransduktionsweg abhängigen meßbaren Signals.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei in der Zelle, welche gemäß a) bereitgestellt wird, wenigstens zwei G-Proteine hergestellt werden.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei in der Zelle, welche gemäß a) bereitgestellt wird, wenigstens zwei G-Proteine ausgewählt aus -6qi4myr, -6qs5myr, -6qi4, -6qs5 oder Galph16 hergestellt werden.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei in der Zelle, welche gemäß a) bereitgestellt wird, wenigstens ein G-Protein ausgewählt aus -6qi4myr, -6qs5myr, -6qi4, -6qs5 hergestellt wird.
- 30 5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche Anspruch 1 bis 4, wobei in der Zelle, welche gemäß a) bereitgestellt wird, wenigstens ein Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß Seq ID Nr. 2, Seq ID Nr. 4, Seq ID Nr. 6 oder Seq ID Nr. 8 hergestellt wird.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Zelle gemäß a) die Zelle einer Wirbeltierspezies, einer Insektenspezies, eines *C. elegans* oder einer Hefe ist.
- 5 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Zelle eine Hela-, 293-, Cos-, CHO-Zelle oder eine Zelle von *Saccharomyces cerevisiae* ist.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, wobei zur Bestimmung des quantitativen oder qualitativen Effekts einer zu untersuchenden 10 chemischen Verbindung mittels eines vom Signaltransduktionsweg abhängigen meßbaren Signals gemäß Anspruch 1 d) die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration verwendet wird.
9. Verfahren zur Identifizierung eines Arzneimittels gemäß einem oder mehreren 15 der Ansprüche 1 bis 8.
10. Verbindung, welche die Wirkung wenigstens eines von einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) abhängigen Signaltransduktionswegs eines biologischen Organismus modifiziert, identifiziert gemäß einem Verfahren der 20 Ansprüche 1 bis 9.
11. Eine Polynukleotidsequenz codierend für ein Polypeptid mit der Eigenschaft eines G-Proteins, wobei das Polypeptid aus einer der folgenden Sequenzen ausgewählt wird:
 - a) ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß Seq ID Nr. 2, Seq ID Nr. 25 4, Seq ID Nr. 6, oder Seq ID Nr. 8;
 - b) ein Polypeptid gemäß a), dem eine oder mehrere Aminosäuren fehlen;
 - c) ein Polypeptid gemäß a), bei dem eine oder mehrere Aminosäuren hinzugefügt sind;
 - 30 d) eine allele Variante des Polypeptids gemäß a).

12. Ein Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, wobei die Polynukleotidsequenz aus einer der folgenden Sequenzen ausgewählt wird:

- 5 a) eine Polynucleotidsequenz gemäß Seq ID Nr. 1, Seq ID Nr. 3, Seq ID Nr. 5, Seq ID Nr. 7 oder deren entsprechende komplementäre Sequenz;
- b) eine Polynukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einer Polynukleotidsequenz gemäß a) hybridisiert.

13. Ein Polypnucleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 oder 12, wobei 10 das Polynukleotid Bestandteil einer rekombinanten Vektorkonstruktion ist.

14. Ein Polynukleotid nach Anspruch 13, wobei die rekombinante Vektorkonstruktion ein in Eukaryonten und/oder Prokaryonten verwendbarer Expressionsvektor ist.

15. Ein Polynukleotid nach Anspruch 14, wobei der Expressionsvektor einen konstitutiven und/oder induzierbaren Promotor enthält.

16. Eine Wirtszelle enthaltend ein Polynucleotid gemäß einem der Ansprüche 11 bis 20 15.

17. Eine Wirtszelle nach Anspruch 16, wobei die Wirtszelle eine humane Zelle ist.

18. Eine Wirtszelle nach Anspruch 17, wobei die Wirtszelle die Zelle einer 25 Wirbeltierspezies, einer Insektspezies, eines C. elegans, eines Bakterium, oder einer Hefe ist.

19. Eine Wirtszelle nach Anspruch 18, wobei die Zelle eine Hela-, 293-, Cos-, CHO-Zelle, eine Escherichia coli-Zelle oder Saccharomyces cerevisiae-Zelle ist.

30 20. Herstellung einer Wirtszelle gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 19 durch Einführung eines Polynucleotids gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 13 bis 15 in eine eukaryotische oder prokaryotische Zelle.

21. Verwendung einer Wirtszelle gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 20 in einem Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9.

22. Ein Protein mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus einer der Sequenzen 5 Seq ID Nr. 2, Seq ID Nr. 4, Seq ID Nr. 6 oder Seq ID Nr. 10.

23. Verfahren zur Herstellung eines Proteins gemäß Anspruch 22 enthaltend folgende Verfahrensschritte:

- a) Herstellung einer Wirtszelle gemäß Anspruch 20;
- b) Anzucht der Wirtszelle aus a) in einem für die Wirtszelle geeigneten Wachstumsmedium sowie eventuell die Induktion der Expression des Proteins;
- c) Gewinnung des Zellmaterials aus c), Aufschluß der Zellen;
- d) Abtrennung eines Proteins gemäß 22 von anderen Proteinen des Aufschlusses der Zellen aus d).

24. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 22 bis 23 zur Herstellung von Antikörpern.

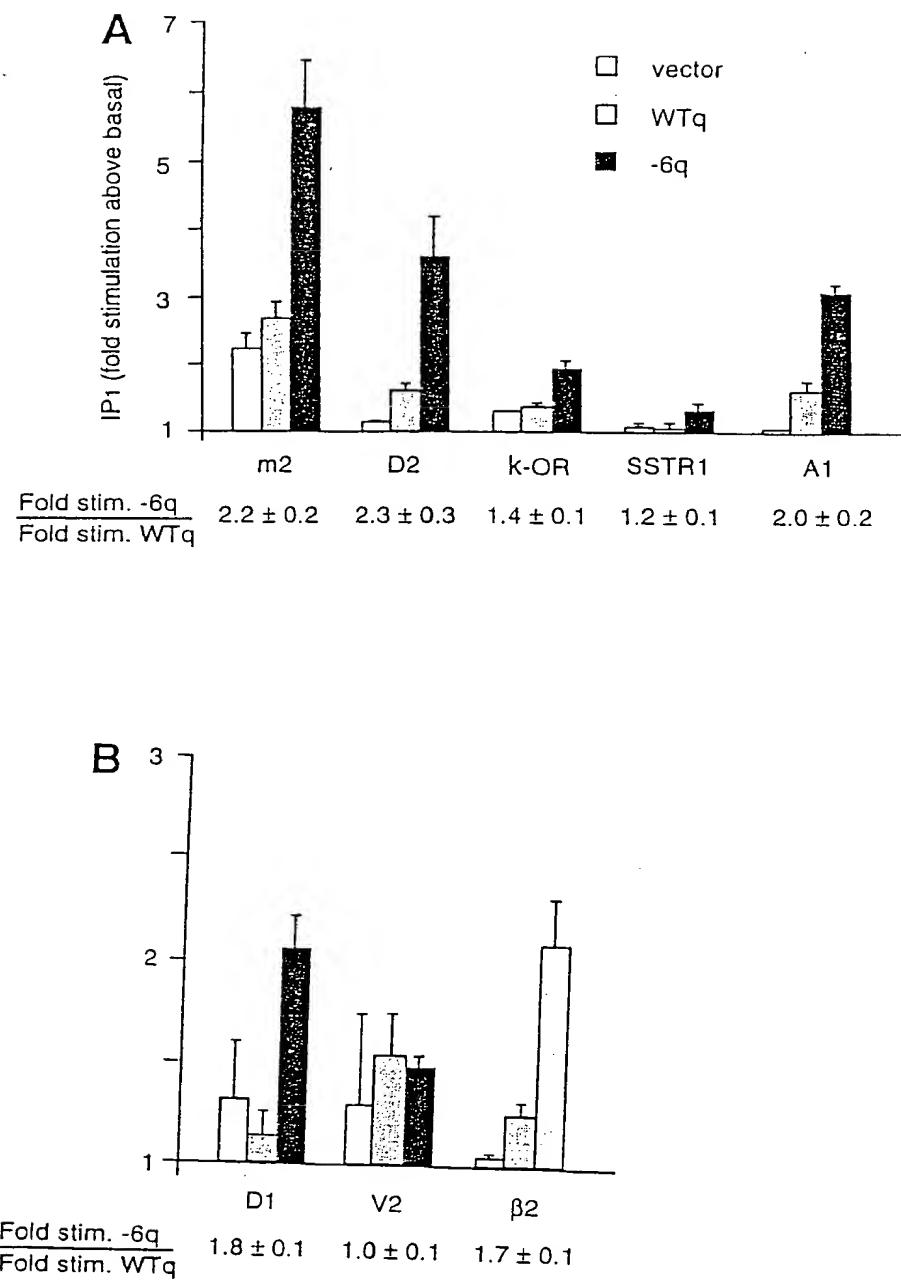
Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein breit einsetzbares Verfahren zur Identifizierung von chemischen Verbindungen, welche G-Protein gekoppelten Rezeptoren modulieren, mittels neuer Hybrid-G-Proteine mit sehr weiter Rezeptorspezifität und sehr hoher Expression sowie chemische Verbindungen, welche durch ein solches Verfahren identifiziert werden können.

Fig. 1

		α N Helix																	
		1	7	9	10	—													
α_q (WT q)		MT	LE	SI	MA	CLS.....EEAK -													
α_{-6q}			MA	C	LSEEAK -													
α_{11}		MT	LE	SM	MA	CLS.....DEVK -													
$\alpha_{i1,3}$		M	G	C	.TLS.....	AEDK -													
$\alpha_{o1,2}$		M	G	C	.TLS.....	AEER -													
α_{t1}		M	G	A	.GAS.....	AEEK -													
α_s		M	G	C	L	G	N	S	K	T	E	D	Q	R	N	E	E	K	-

Fig. 2



Met Thr Leu Glu Ser Ile Met Ala Cys Cys Leu Ser Glu Glu Ala Lys
1 5 10 15

Glu Ala Arg Arg Ile Asn Asp Glu Ile Glu Arg His Val Arg Arg Asp
20 25 30

Lys Arg Asp Ala Arg Arg Glu Leu Lys Leu Leu Leu Gly Thr Gly
35 40 45

Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Ser Asp Glu Asp Lys Arg Gly Phe Thr Lys Leu Val Tyr
65 70 75 80

Gln Asn Ile Phe Thr Ala Met Gln Ala Met Ile Arg Ala Met Asp Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Pro Tyr Lys Tyr Glu His Asn Lys Ala His Ala Gln Leu
100 105 110

Val Arg Glu Val Asp Val Glu Lys Val Ser Ala Phe Glu Asn Pro Tyr
115 120 125

Val Asp Ala Ile Lys Ser Leu Trp Asn Asp Pro Gly Ile Gln Glu Cys
130 135 140

Tyr Asp Arg Arg Arg Glu Tyr Gln Leu Ser Asp Ser Thr Lys Tyr Tyr
145 150 155 160

Leu Asn Asp Leu Asp Arg Val Ala Asp Pro Ala Tyr Leu Pro Thr Gln
165 170 175

Gln Asp Val Leu Arg Val Arg Val Pro Thr Thr Gly Ile Ile Glu Tyr
180 185 190

Pro Phe Asp Leu Gln Ser Val Ile Phe Arg Met Val Asp Val Gly Gly
195 200 205

Gln Arg Ser Glu Arg Arg Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asn Val Thr
210 215 220

Ser Ile Met Phe Leu Val Ala Leu Ser Glu Tyr Asp Gln Val Leu Val
225 230 235 240

Glu Ser Asp Asn Glu Asn Arg Met Glu Glu Ser Lys Ala Leu Phe Arg
245 250 255

Thr Ile Ile Thr Tyr Pro Trp Phe Gln Asn Ser Ser Val Ile Leu Phe

260

265

270

Leu Asn Lys Lys Asp Leu Leu Glu Glu Lys Ile Met Tyr Ser His Leu

275

280

285

Val Asp Tyr Phe Pro Glu Tyr Asp Gly Pro Gln Arg Asp Ala Gln Ala

290

295

300

Ala Arg Glu Phe Ile Leu Lys Met Phe Val Asp Leu Asn Pro Asp Ser

305

310

315

320

Asp Lys Ile Ile Tyr Ser His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Glu Asn

325

330

335

Ile Arg Phe Val Phe Ala Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn

340

345

350

Leu Lys Glu Tyr Asn Leu Val

355

<210> 3

<211> 1062

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

atggggtgct gcctgagcga ggaggccaag gaagcccgcc ggatcaacga cgagatcgag 60
ccggcacgtcc gcagggacaa gcgggacgccc cggccggagc tcaagctgct gctgctcg 120
acaggagaga gtggcaagag tacgtttatc aagcagatga gaatcatcca tgggtcagga 180
tactctgatg aagataaaag gggcttcacc aagctgggtgt atcagaacat cttcacggcc 240
atgcaggcca tgatcagagc catggacaca ctcaagatcc catacaagta tgagcacaat 300
aaggctcatg cacaattagt tcgagaagtt gatgtggaga aggtgtctgc ttttgagaat 360
ccatatgttag atgcaataaa gagtttatgg aatgatcctg gaatccagga atgctatgtat 420
agacgacgag aatatcaatt atctgactct accaaatact atcttaatga cttggaccgc 480
gtagctgacc ctgcctaccc gcctacgcaa caagatgtgc ttagagttcg agtccccacc 540
acagggtatca tcgaataaccc ctttgactta caaagtgtca ttttcagaat ggtcgatgt 600
gggggccaat ggtcagagag aagaaaatgg atacactgct ttgaaaatgt cacctctatc 660
atgtttcttag tagcgtttag tgaatatgtat caagttctcg tggagtcaga caatgagaac 720
cgaatggagg aaagcaaggc tctctttaga acaattatca cataccctg gttccagaac 780
tcctcggtta ttctgttctt aaacaagaaa gatcttcttag aggagaaaat catgtattcc 840
catctagtcg actacttccc agaataatgtat ggaccccaga gagatgcccga ggcagcccg 900
gaattcatttc tgaagatgtt cgtggacctg aacccagaca gtgacaaaat tatctactcc 960
cacttcacgt gcgccacaga caccgagaat atccgcttttg tctttgctgc cgtcaaggac 1020
accatcctcc agttgaacct gaaggagtgt ggcctttctt aa 1062

<210> 4
<211> 353
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Met Gly Cys Cys Leu Ser Glu Glu Ala Lys Glu Ala Arg Arg Ile Asn
1 5 10 15

Asp Glu Ile Glu Arg His Val Arg Arg Asp Lys Arg Asp Ala Arg Arg
20 25 30

Glu Leu Lys Leu Leu Leu Gly Thr Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr
35 40 45

Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ser Gly Tyr Ser Asp Glu
50 55 60

Asp Lys Arg Gly Phe Thr Lys Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Thr Ala
65 70 75 80

Met Gln Ala Met Ile Arg Ala Met Asp Thr Leu Lys Ile Pro Tyr Lys
85 90 95

Tyr Glu His Asn Lys Ala His Ala Gln Leu Val Arg Glu Val Asp Val
100 105 110

Glu Lys Val Ser Ala Phe Glu Asn Pro Tyr Val Asp Ala Ile Lys Ser
115 120 125

Leu Trp Asn Asp Pro Gly Ile Gln Glu Cys Tyr Asp Arg Arg Arg Glu
130 135 140

Tyr Gln Leu Ser Asp Ser Thr Lys Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu Asp Arg
145 150 155 160

Val Ala Asp Pro Ala Tyr Leu Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu Arg Val
165 170 175

Arg Val Pro Thr Thr Gly Ile Glu Tyr Pro Phe Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Val Ile Phe Arg Met Val Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Arg
195 200 205

Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asn Val Thr Ser Ile Met Phe Leu Val
210 215 220

Fig. 6

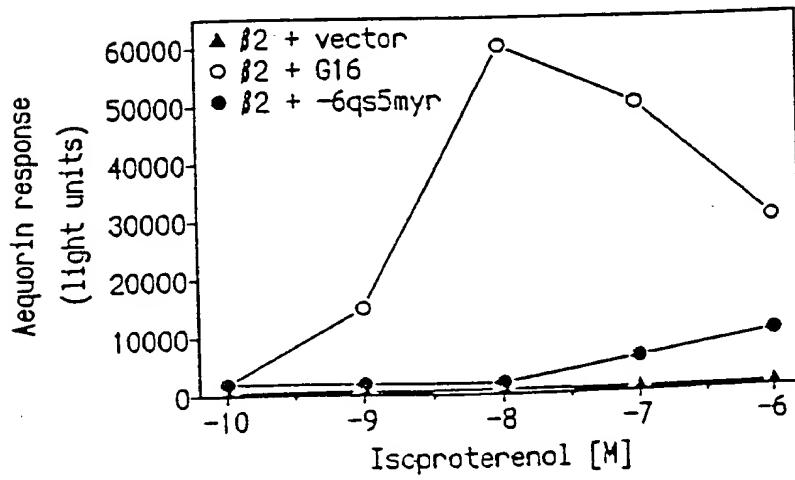
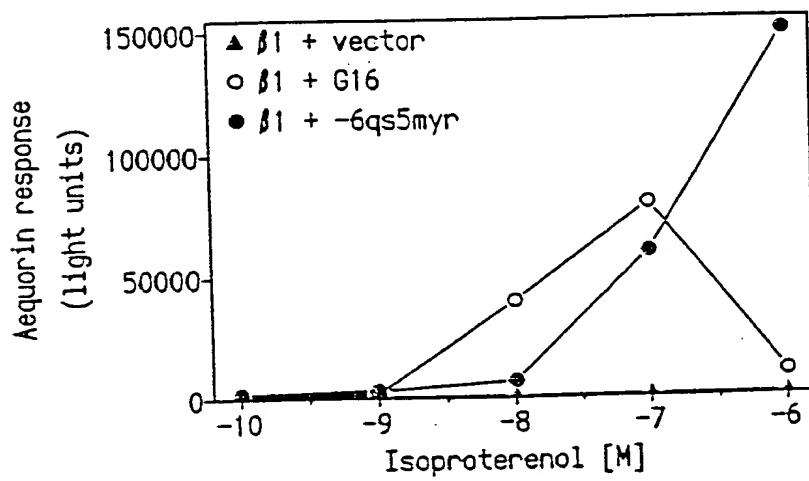
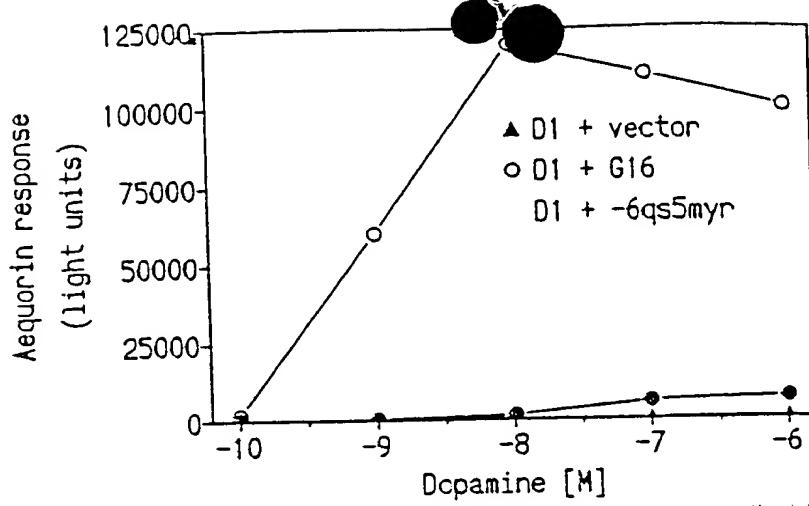
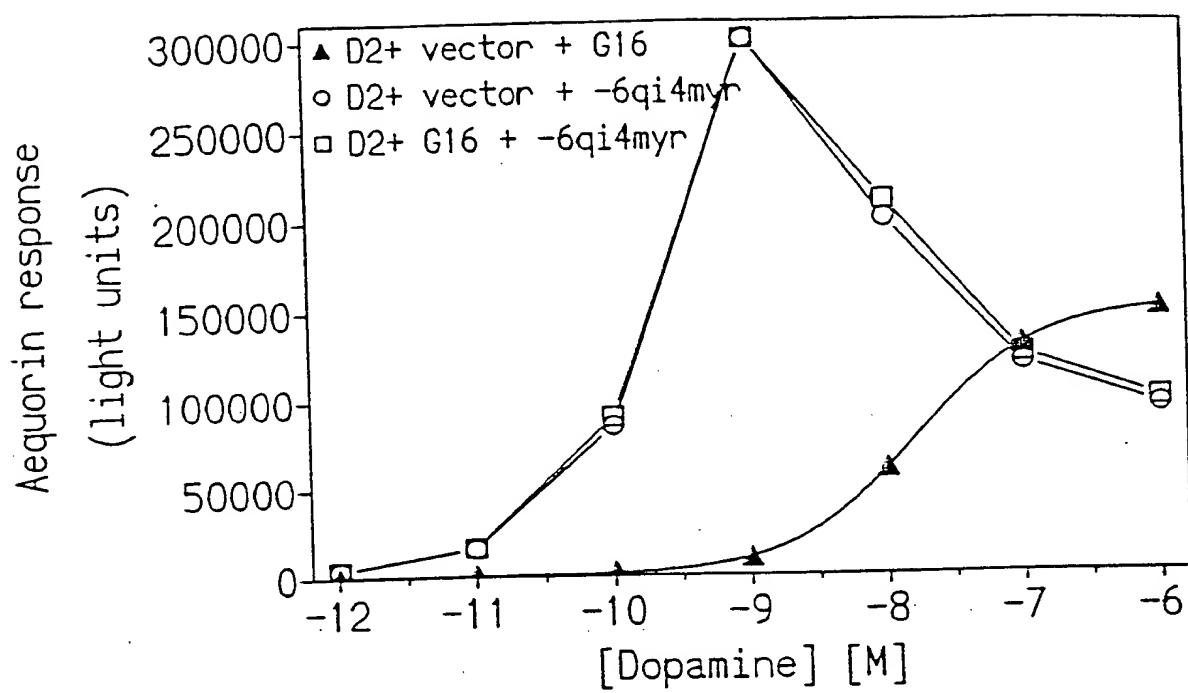


Fig. 7



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> Breit einsetzbares Verfahren zur Identifizierung von
Modulatoren von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

<130> AVE D-2000/A033

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1080

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

atgactctgg agtccatcat ggcgtgctgc ctgagcgagg aggccaagga agcccccggg 60
atcaacgacg agatcgagcg gcacgtccgc agggacaagc gggacgccccg ccggggagctc 120
aagctgctgc tgctcgggac aggagagagt ggcagatgata cgtttatcaa gcagatgaga 180
atcatccatg ggtcaggata ctctgatgaa gataaaaggg gcttcaccaa gctgggttat 240
cagaacatct tcacggccat gcaggccatg atcagagcca tggacacact caagatccca 300
tacaagtatg agcacaataa ggctcatgca caattatgttc gagaagttga tttggagaag 360
gtgtctgc ttgagaatcc atatgtatgat gcaataaaaga gtttatggaa tgatcctgga 420
atccaggaat gctatgatag acgacgagaa tatcaattat ctgactctac caaatactat 480
cttaatgact tggaccgcgt agctgaccct gcctacctgc ctacgcaaca agatgtgctt 540
agagttcgag tccccaccac agggatcatc gaataccccc ttgacttaca aagtgtcatt 600
ttcagaatgg tcgatgttagg gggccaaagg tcagagagaa gaaaatggat acactgctt 660
gaaaatgtca cctctatcat gtttctatgt ggcgttagt aatatgatca agttctcg 720
gagtcagaca atgagaaccg aatggaggaa agcaaggctc tctttagaac aattatcaca 780
taccccttgtt tccagaactc ctcgggttatt ctgttcttaa acaagaaaaga tcttcttagag 840
gagaaaatca tgtattccca tctagtcgac tacttcccaag aatatgatgg acccccagaga 900
gatgcccagg cagccccgaga attcattctg aagatgttcg tggacctgaa cccagacagt 960
gacaaaatata tctactccca cttcacgtgc gccacagacaca ccgagaatat ccgctttgtc 1020
tttgcgtcccg tcaaggacac catcctccag ttgaacctga aggagttacaa tctggcttaa 1080

<210> 2

<211> 359

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Fig. 3

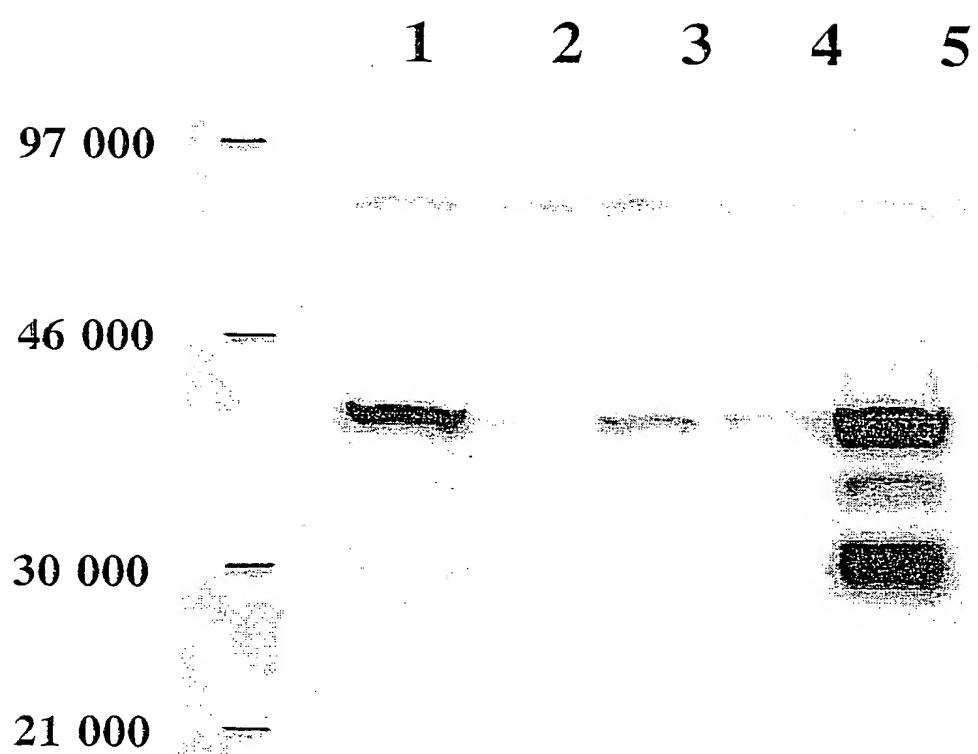


Fig. 4

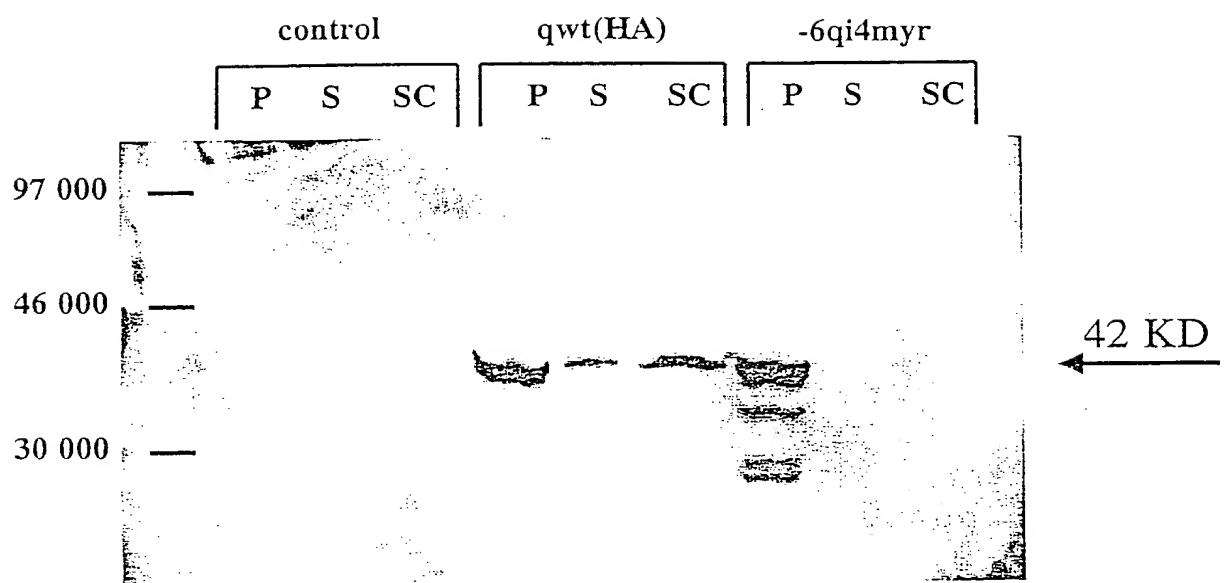
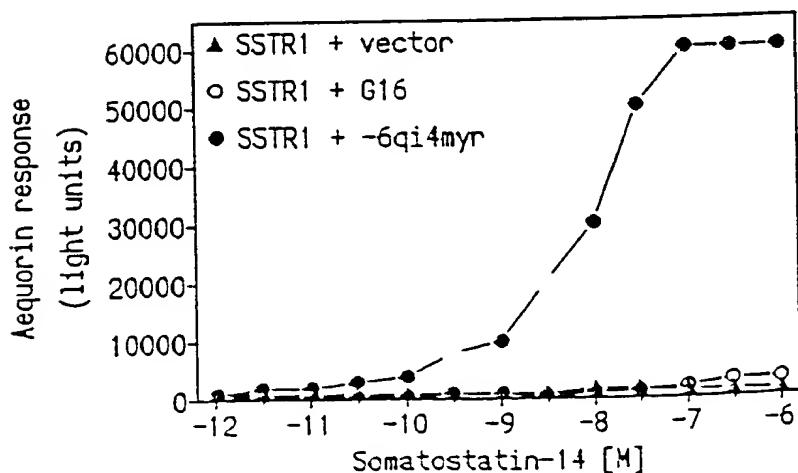
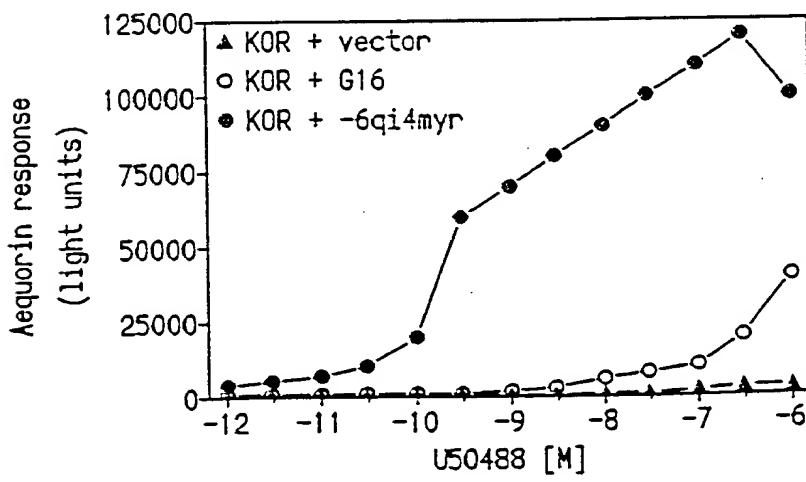
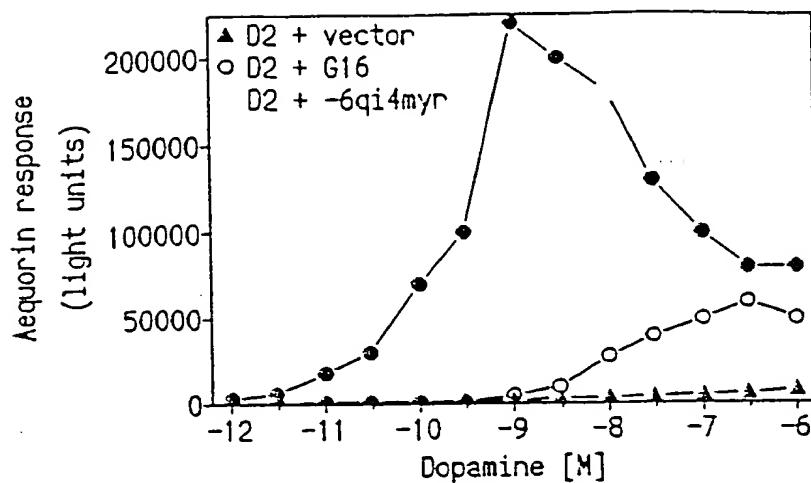


Fig. 5



Ala Leu Ser Glu Tyr Asp Gln Val Leu Val Glu Ser Asp Asn Glu Asn
225 230 235 240

Arg Met Glu Glu Ser Lys Ala Leu Phe Arg Thr Ile Ile Thr Tyr Pro
245 250 255

Trp Phe Gln Asn Ser Ser Val Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys Asp Leu
260 265 270

Leu Glu Glu Lys Ile Met Tyr Ser His Leu Val Asp Tyr Phe Pro Glu
275 280 285

Tyr Asp Gly Pro Gln Arg Asp Ala Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Leu
290 295 300

Lys Met Phe Val Asp Leu Asn Pro Asp Ser Asp Lys Ile Ile Tyr Ser
305 310 315 320

His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Glu Asn Ile Arg Phe Val Phe Ala
325 330 335

Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Cys Gly Leu
340 345 350

Phe

<210> 5

<211> 1062

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

atggcgtgct gcctgagcga ggaggccaag gaagccggc ggatcaacga cgagatcgag 60
cggcacgtcc gcagggacaa gcgggacgcc cggccggagc tcaagctgct gctgctcggg 120
acaggagaga gtggcaagag tacgtttatc aagcagatga gaatcatcca tgggtcagga 180
tactctgatg aagataaaag gggtttacc aagctgggtg atcagaacat cttcacggcc 240
atgcaggcca tgatcagagc catggacaca ctcagaatcc catacaagta tgagcacaat 300
aaggctcatg cacaattagt tcgagaagtt gatgtggaga aggtgtctgc ttttggaaat 360
ccatatgtatg atgcaataaa gagtttatgg aatgatcctg gaatccagga atgctatgtat 420
agacgacgag aatatcaatt atctgactct accaaataact atcttaatga cttggaccgc 480
gtagctgacc ctgcctaccc gcctacgcaa caagatgtgc ttagagttcg agtccccacc 540
acaggatca tcgaataaccc ctttgactta caaagtgtca ttttcagaat ggtcgatgt 600
ggggccaaa ggtcagagag aagaaaatgg atacactgct ttgaaaatgt cacctctatc 660
atgtttctag tagcgcttag tgaatatgtat caagttctcg tggagtcaga caatgagaac 720

cgaatggagg aaagcaaggc tctctttaga acaattatca cataccctg gttccagaac 780
tcctcggtt ttctgttctt aaacaagaaa gatcttctag aggagaaaat catgtattcc 840
catctagtcg actacttccc agaataatgtat ggaccccaga gagatgcccga ggcagccga 900
gaattcattc tgaagatgtt cgtggacctg aacccagaca gtgacaaaat tatctactcc 960
cacttcacgt gcccacaga caccgagaat atccgctttg tcttgctgc cgtcaaggac 1020
accatcctcc agttgaacct gaaggagtgt ggcctttctt aa 1062

<210> 6

<211> 353

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Met Ala Cys Cys Leu Ser Glu Glu Ala Lys Glu Ala Arg Arg Ile Asn
1 5 10 15

Asp Glu Ile Glu Arg His Val Arg Arg Asp Lys Arg Asp Ala Arg Arg
20 25 30

Glu Leu Lys Leu Leu Leu Gly Thr Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr
35 40 45

Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ser Gly Tyr Ser Asp Glu
50 55 60

Asp Lys Arg Gly Phe Thr Lys Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Thr Ala
65 70 75 80

Met Gln Ala Met Ile Arg Ala Met Asp Thr Leu Lys Ile Pro Tyr Lys
85 90 95

Tyr Glu His Asn Lys Ala His Ala Gln Leu Val Arg Glu Val Asp Val
100 105 110

Glu Lys Val Ser Ala Phe Glu Asn Pro Tyr Val Asp Ala Ile Lys Ser
115 120 125

Leu Trp Asn Asp Pro Gly Ile Gln Glu Cys Tyr Asp Arg Arg Arg Glu
130 135 140

Tyr Gln Leu Ser Asp Ser Thr Lys Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu Asp Arg
145 150 155 160

Val Ala Asp Pro Ala Tyr Leu Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu Arg Val
165 170 175

Arg Val Pro Thr Thr Gly Ile Ile Glu Tyr Pro Phe Asp Leu Gln Ser

180

185

190

Val Ile Phe Arg Met Val Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Arg
195 200 205

Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asn Val Thr Ser Ile Met Phe Leu Val
210 215 220

Ala Leu Ser Glu Tyr Asp Gln Val Leu Val Glu Ser Asp Asn Glu Asn
225 230 235 240

Arg Met Glu Glu Ser Lys Ala Leu Phe Arg Thr Ile Ile Thr Tyr Pro
245 250 255

Trp Phe Gln Asn Ser Ser Val Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys Asp Leu
260 265 270

Leu Glu Glu Lys Ile Met Tyr Ser His Leu Val Asp Tyr Phe Pro Glu
275 280 285

Tyr Asp Gly Pro Gln Arg Asp Ala Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Leu
290 295 300

Lys Met Phe Val Asp Leu Asn Pro Asp Ser Asp Lys Ile Ile Tyr Ser
305 310 315 320

His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Glu Asn Ile Arg Phe Val Phe Ala
325 330 335

Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Cys Gly Leu
340 345 350

Phe

<210> 7

<211> 1062

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

atggcgtgct gcctgagcga ggaggccaag gaagcccgcc ggatcaacga cgagatcgag 60
cggcacgtcc gcagggacaa gcgggacgcc cgccgggagc tcaagctgct gctgctcg 120
acaggagaga gtggcaagag tacgtttatc aagcagatga gaatcatcca tgggtcagga 180
tactctgatg aagataaaag gggcttcacc aagctggtgt atcagaacat cttcacggcc 240
atgcaggcca tgatcagagc catggacaca ctcagatcc catacaagta tgagcacaat 300

aaggctcatg cacaattagt tcgagaagtt gatgtggaga aggtgtctgc ttttggaaat 360
ccatatgtatg atcaataaa gagtttatgg aatgatcctg gaatccagga atgctatgtat 420
agacgacgag aatatcaatt atctgactct accaaatact atcttaatga cttggaccgc 480
gtagctgacc ctgcctaccc gcctacgcaa caagatgtgc tttagagttcg agtccccacc 540
acaggatca tcgaataaccc ctttgactta caaagtgtca ttttcagaat ggtcgatgtat 600
ggggccaaa ggtcagagag aagaaaatgg atacactgct ttgaaaatgt cacctctatc 660
atgtttcttag tagcgcttag tgaatatgtat caagttctcg tggagtcaga caatgagaac 720
cgaatggagg aaagcaaggc tctctttaga acaattatca cataccctg gttccagaac 780
tcctcggtt ttctgttctt aaacaagaaa gatcttcttag aggagaaaat catgtattcc 840
catctagtcg actacttccc agaatatgtat ggaccccaga gagatgccc ggcagccca 900
gaattcattc tgaagatgtt cgtggacctg aacccagaca gtgacaaaat tatctactcc 960
cacttcacgt gcgccacaga caccgagaat atccgctttg tctttgctgc cgtcaaggac 1020
accatcctcc agttgaacct gaaggagtgt ggcctttctt aa 1062

<210> 8

<211> 353

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 8

Met	Ala	Cys	Cys	Leu	Ser	Glu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Arg	Arg	Ile	Asn
1				5					10					15	

Asp	Glu	Ile	Glu	Arg	His	Val	Arg	Arg	Asp	Lys	Arg	Asp	Ala	Arg	Arg
					20				25				30		

Glu	Leu	Lys	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Gly	Glu	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	
		35				40						45			

Phe	Ile	Lys	Gln	Met	Arg	Ile	Ile	His	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Asp	Glu
				50				55				60			

Asp	Lys	Arg	Gly	Phe	Thr	Lys	Leu	Val	Tyr	Gln	Asn	Ile	Phe	Thr	Ala
	65				70					75			80		

Met	Gln	Ala	Met	Ile	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Leu	Lys	Ile	Pro	Tyr	Lys
			85					90				95			

Tyr	Glu	His	Asn	Lys	Ala	His	Ala	Gln	Leu	Val	Arg	Glu	Val	Asp	Val
			100					105				110			

Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Phe	Glu	Asn	Pro	Tyr	Val	Asp	Ala	Ile	Lys	Ser
	115					120					125				

Leu	Trp	Asn	Asp	Pro	Gly	Ile	Gln	Glu	Cys	Tyr	Asp	Arg	Arg	Arg	Glu
	130					135					140				

Tyr Gln Leu Ser Asp Ser Thr Lys Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu Asp Arg
145 150 155 160

Val Ala Asp Pro Ala Tyr Leu Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu Arg Val
165 170 175

Arg Val Pro Thr Thr Gly Ile Ile Glu Tyr Pro Phe Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Val Ile Phe Arg Met Val Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Arg
195 200 205

Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asn Val Thr Ser Ile Met Phe Leu Val
210 215 220

Ala Leu Ser Glu Tyr Asp Gln Val Leu Val Glu Ser Asp Asn Glu Asn
225 230 235 240

Arg Met Glu Glu Ser Lys Ala Leu Phe Arg Thr Ile Ile Thr Tyr Pro
245 250 255

Trp Phe Gln Asn Ser Ser Val Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys Asp Leu
260 265 270

Leu Glu Glu Lys Ile Met Tyr Ser His Leu Val Asp Tyr Phe Pro Glu
275 280 285

Tyr Asp Gly Pro Gln Arg Asp Ala Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Leu
290 295 300

Lys Met Phe Val Asp Leu Asn Pro Asp Ser Asp Lys Ile Ile Tyr Ser
305 310 315 320

His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Glu Asn Ile Arg Phe Val Phe Ala
325 330 335

Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Cys Gly Leu
340 345 350

Phe

<210> 9
<211> 1128
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 9

gccccatggccc gctcgctgac ctggcgctgc tgccccctgggt gcctgacgga gnatgagaag 60
gcccggccccc ggggtggacca ggagatcaac aggatcctct tggagcagaa gaagcaggac 120
cgcggggagc tgaagctgct gcttttggc ccaggcgaga gcgggaagag cacttcatc 180
aagcagatgc ggatcatcca cggcgccggc tactcgagg aggagcgcaa gggcttccgg 240
ccccctggctt accagaacat cttcggttcc atgcgggcca tgatcgaggc catggagcgg 300
ctgcagatcc cattcagcag gcccggagc aagcaccacg ctagcctgggt catgagccag 360
gaccctata aagtgaccac gtttggagaag cgctacgctg cggccatgca gtggctgtgg 420
agggatgccc gcatccggc ctgctatgag cgtcgccggg aattccaccc gctcgattca 480
gccgtgtact acctgtccca cctggagcgc atcaccgggg agggctacgt ccccacagct 540
caggacgtgc tccgcagccg catgcccacc actggcatca acgagttactg cttctccgtg 600
cagaaaacca acctgcggat cgtggacgac gggggccaga agtcagagcg taagaaaatgg 660
atccattgtt tcgagaacgt gatgccttc atctacctgg cctcaactgag tgaatacgac 720
cagtgcctgg aggagaacaa ccaggagaac cgcacatgaa agagcctcgc attgtttggg 780
actatcctgg aactaccctg gttcaaaagc acatccgtca tcctctttct caacaaaacc 840
gacatcctgg aggagaaaat ccccacctcc cacctggcta cctatttccc cagtttccag 900
ggccctaagc aggatgctga ggcagccaag agttcatcc tggacatgta cacgaggatg 960
tacaccgggt gcgtggacgg ccccgaggac agcaagaagg ggcacgatc ccgacgcctt 1020
ttcagccact acacatgtgc cacagacaca cagaacatcc gcaaggtctt caaggacgtg 1080
cgggactcgg tgctcgcccg ctacctggac gagatcaacc tgctgtga 1128

<210> 10

<211> 374

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu
1 5 10 15

Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu
20 25 30

Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile
50 55 60

Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro
65 70 75 80

Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala
85 90 95

Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His

100

105

110

Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu
115 120 125

Lys Arg Tyr Ala Ala Ala Met Gln Trp Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile
130 135 140

Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala
145 150 155 160

Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Val
165 170 175

Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile
180 185 190

Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Gln Lys Thr Asn Leu Arg Ile Val Asp
195 200 205

Val Gly Gly Gln Lys Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu
210 215 220

Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln
225 230 235 240

Cys Leu Glu Glu Asn Asn Gln Glu Asn Arg Met Lys Glu Ser Leu Ala
245 250 255

Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val
260 265 270

Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Ile Pro Thr
275 280 285

Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Lys Gln Asp
290 295 300

Ala Glu Ala Ala Lys Arg Phe Ile Leu Asp Met Tyr Thr Arg Met Tyr
305 310 315 320

Thr Gly Cys Val Asp Gly Pro Glu Gly Ser Lys Lys Gly Ala Arg Ser
325 330 335

Arg Arg Leu Phe Ser His Tyr Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Asn Ile
340 345 350

Arg Lys Val Phe Lys Asp Val Arg Asp Ser Val Leu Ala Arg Tyr Leu

355

360

365

Asp Glu Ile Asn Leu Leu
370